IVD-REF: PS - Free PSA	پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و نوآوری	کیت الایزا Free PSA
Ver. No: 04		Free PSA ELISA KIT

معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور۱-۶ (۰، ۰.۲۵، ۱، ۲.۵، ۵، و ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر) در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده	6 ×0.5 mL	6 ×1.0 mL	آماده مصرف
دو نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	2 ×0.5 mL	2 ×1.0 mL	آماده مصرف
کونژوگه(قرمز رنگ)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف(اسید کلریدریک یک مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

کاربرد:

کیت Free PSA ELISA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه گیری کمی شکل آزاد آنتی ژن اختصاصی پروستات Free Prostate-specific Antigen (f-PSA) در سرم یا پلاسما طراحی شده است.

مقدمه :

آنتی ژن اختصاصی پروستات یا PSA نوعی سرین پروتئاز از خانواده کالیکرئین هاست که منحصراً در سلول های اپیتلیال غده پروستات ساخته می شود. ساخت PSA تحت تنظیم پذیرنده های هورمون های جنسی مردانه یا آندروژن ها است. به دلیل اختصاصیت بافتی بسیار زیاد ازسنجش PSA به عنوان شاخص تومورال، تاکنون بیشترین استفاده شده است. قسمت اعظم PSA ساخته شده در پروستات وارد مایع منی شده و نقش خارج کردن مایع منی از حالت انعقاد را برعهده دارد.

آنتی ژن اختصاصی پروستات به دو فرم متصل و آزاد در بدن وجود دارد. فرم متصل PSA در حدود ۷۵ درصد PSA تام می باشد. بیشترین درصد اتصال PSA به آلفا ۱-آنتی کموتریپسین (ACT) و به میزان بسیار کمی سایر پروتئازها مانند آلفا-دو- ماکروگلوبولین و مهارکننده آلفا پروتئازی(API) می باشد. فرم آزاد PSA در حدود ۲۵ درصد PSA تام می باشد. در سنجش PSA تام هر دو فرم اندازه گیری می شوند.

سرطان پروستات یکی از مشکلات شایع مردان به ویژه در سنین بالا است. بررسی های مختلف شیوع سرطان پروستات را در مردان بین ۷۰ تا ۷۹ سال بین ۳۶ تا٪۵۱ نشان داده است. طی ارزیابی های صورت گرفته برروی آنالیزهای تشخیصی و درمانی انجام شده متعاقب کسب نتایج بالای آزمایش PSA مشخص گردید که آزمایش PSA تام به تنهایی از حساسیت و ویژگی (تشخیصی) کافی برای تشخیص یا غربالگری بدخیمی های غده پروستات برخوردار نیست و افزایش آن در موارد غیربدخیم، نظیر بزرگی خوش خیم پروستات(BPH) مشاهده می شود.

با توجه به محدودیت های سنجش PSA تام مانند وجود نتایج مثبت کاذب، سطح نرمال PSA در بعضی افراد مبتلا به سرطان پروستات، وجود گزارش های مبنی بر افزایش سطح PSA در افرادی که مبتلا به سرطان نیستند. امروزه از سنجش نسبت درصد PSA آزاد به PSAتام برای بررسی وضعیت بیمار در کنار سایر مولفه های بالینی استفاده می شود. این مؤلفه بخصوص در زمانی که PSA تام افراد بین ۴ تا ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر است، و نتیجه بیوپسی آنها منفی شده است ، ارزش بالایی برای ارزیابی کلینیکی دارد.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش free PSA شرکت تولیدی- تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه االیزا نوع ساندویچی می باشد. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. در روش آزمایش، استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار همراه با کونژوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه شاخص های اختصاصی free PSA یکی کونژوگه با بیوتین و دیگری کونژوگه با آنزیم HRP است و f.PSA را از دو جایگاه متفاوت شناسایی می کنند به چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین اضافه می شوند. f.PSA موجود در استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در آمده و مجموعه از طریق بیوتین به استرپتاویدین فازجامد متصل می شود. سپس اجزای اتصال نایافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار f.PSA موجود در سرم نسبت مستقیم دارد .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.

۲. آب مقطر با هدایت الکتریکی کمتر از 1 µS/cm

۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.

۴. کاغذ جاذب رطوبت

۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول واش باشد.

نگهداری کیت :

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***

۲. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.

۳. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.

۴. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نم گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.

۵. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.

۶. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.

۷. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.

۸. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.

۹. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.

۱۰. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها، استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.

۲. از نمونه های با کدورت بالا، هموليز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.

۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در$-۲۰^{\circ}C$ سانتیگراد نگهداری شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد.

۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم fPSA در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش fPSA در مایع منی یا سایر مایعات بیولوژیک و پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.

۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.

۴. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. در این کیت برای ساخت برخی اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B(HBsAg) ، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

۷. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

۸. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۰-۲۷°C) برسند.

۲. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.

۳. در مواردی که مقدار f.PSA نمونه بیش از 10 ng/mL باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و ضریب رقت را در محاسبه نهایی منظور نمایید.

۴. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا۲۰ تا۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.

۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۷. بهتراست استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی(Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورداستفاده قرار گیرد.

۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.

۹. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.

۱۰. در کیت fPSA شرکت پیشگامان سنجش به دلیل استفاده از استرپتاویدین برای پوشاندن کف چاهک، تا زمان افزودن کونژوگه عملاً واکنشی در چاهک رخ نمی دهد، بنابراین، جز خطای ناشی از تبخیر نمونه(در صورتی که ریختن استانداردها، کنترل ها و نمونه ها بیش از۵ دقیقه به طول بیانجامد) خطای قابل توجهی از ناحیه اختلاف زمانی بین ریختن اولین نمونه و آخرین نمونه رخ نمی دهد. با این وجود پیپتینگ چاهک ها با محلول کونژوگه نباید بیشتر از ۵ دقیقه به طول بیانجامد، لذا توصیه می شود، اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی، از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده شود یا بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.

۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.

۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

۱۳. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.

۱۴. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش برروی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

۱۵. با توجه به ارزش بالینی تعیین نسبت f.PSA به PSA تام، تاکید می گردد هر دو تست با کیت الایزا پیشگامان سنجش، تعیین و گزارش گردند. معتبرترین داده ها زمانی است که از لات نامبر یکسان برای سنجش هر دو تست استفاده گردد.

روش انجام آزمایش:

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق(۲۰-۲۷°C) انکوبه کنید.

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت ۵ بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- 50 میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا رنگ زا را اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی(محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

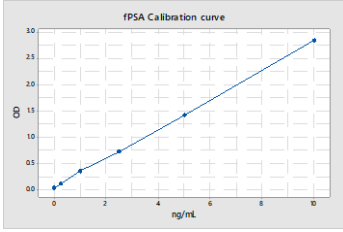
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده های داخلی است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستوالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت f.PSA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه(Point-to-point) استفاده کنید.

داده های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان داده های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

Row	ng/mL	OD
1	0	0.03
2	0.25	0.11
3	1.0	0.35
4	2.5	0.72
5	5.0	1.41
6	10	2.83



کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای هر یک برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل داخل کیت ، آزمایشگاه می تواند از نمونه های سرم انباشته(Pooled serum) که در خود آزمایشگاه

تهیه شده یا نمونه های کنترل خارجی نیز استفاده نماید. در دو حالت یادشده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف ، انحراف معیار نتایج و کرانه های بالایی(UCL) و پایینی(LCL) قابل قبول را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع:

زمانی که غلظت PSA تام بین ۴ تا ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر باشد، نسبت Free PSA به PSA تام، به عنوان یک معیار کمکی جهت افتراق بروز سرطان پروستات و بزرگی خوش خیم پروستات می باشد. لازم به ذکر است آزمایش PSA تام ، free PSA و نسبت این دو آنالیت، معیار های کمک کننده بوده و لازمه تشخیص سرطان پروستات، بیوپسی می باشد.

نسبت **free PSA** به **PSA** تام	احتمال بروز سرطان
0-10%	56%
10%-15%	28%
15%-20%	20%
20%-25%	16%
25%≤	8%

محدوده طبیعی با حدود اطمینان ۹۵ درصدی	**Up to 0.9 ng/ml**

محدوده مورد انتظار :

با مطالعه صورت گرفته بر روی ۲۵۰ نمونه سرم مردان سالم، مقدار free PSA با کیت شرکت پیشگامان سنجش به روش الایزا به صورت زیر می باشد. پیشنهاد می گردد هر آزمایشگاهی مقادیر طبیعی خود را به دست آورد.

خصوصیات اجرایی کیت

۱- حد پایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement) :

حد شاهد(Limit-of-Blank: LOB) و حد آشکارسازی(Limit-of-detection: LOD)مطابق با راهنمای EP 17-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

به طور خلاصه حد شاهد تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ ام (95^{th} percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد شاهد معادل غلظتی درنظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. با این روش حد شاهد معادل 0.022 ng/mL بدست

آمد. برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(n=۲۰×۳=۶۰) با محتوای f.PSA کمتر از **0.1ng/mL** که مقدار f.PSA آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. و از رابطه زیر حد آشکارسازی معادل ***0.05 ng/mL*** تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_{Low}$$

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت f.PSA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و سه انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار در نقاط مختلف بازه اندازه گیری(0-10 ng/mL) مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

طی ۱۰ روزکاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند(۱۰×۳×۳×۲). نتایج به کمک یک نرم افزار صفحه گسترده و با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است.

Sample Description	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	**0.33**	**0.017**	**5.15**	**0.036**	**10.91**
Patient Pool	**3.04**	**0.125**	**4.11**	**0.428**	**14.08**
Patient Pool	**7.20**	**0.481**	**6.67**	**0.581**	**8.07**

۳- اختصاصیت(Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP 07-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI)، جهت تعیین میزان تداخل از ناحیه مداخله گرهای متداول موجود در سرم انجام گردید. به اختصار برای ارزیابی هر مداخله گر سرم بیمار در دو ناحیه غلظتی به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی افزونه حاوی مداخله گر و به دیگری حجم مساوی افزونه فاقد مداخله گر(بافر PBS) اضافه و حد تداخل مطابق با فرمول زیر محاسبه گردید. نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

$$\%interference = \frac{measured\ value - true\ value}{true\ value} \times 100$$

Compound	Concentration with no Significant interference
Lipemia (Intralipid)	**1000 mg/dL**
Bilirubin(unconjugated)	**20 mg/dL**
hemoglobin	**500 mg/dL**

۴- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه 9.65 ng/mL را با نمونه دیگری با غلظت 0.34 ng/mL به نسبت های مختلف با یکدیگر رقیق کردیم و رقت های مختلف را به صورت مضاعف اندازه گیری ونتایج را با مقادیر موردانتظار که از ضرب غلظت اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود مقایسه کردیم و میزان بازیابی و سوگرایی را در نقاط مختلف محاسبه کردیم، که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

No	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mL)	Rep 2 (ng/mL)	recovery%	%Bias
1	1	9.65	9.33	9.97	NA	NA
2	0.9	8.72	8.39	8.53	97%	-2.9%
3	0.8	7.79	7.48	7.97	99%	-0.8%
4	0.7	6.86	6.88	6.97	101%	1.0%
5	0.6	5.93	6.20	7.06	112%	11.9%
6	0.5	4.99	5.24	5.71	110%	9.6%
7	0.4	4.06	4.59	4.46	111%	11.5%
8	0.3	3.13	3.32	3.33	106%	6.1%
9	0.2	2.20	2.34	2.42	108%	8.3%
10	0.1	1.27	1.29	1.32	103%	2.8%
11	0	0.34	0.34	0.34	NA	NA

NA: کاربردی ندارد

۵- درستی(Trueness):

۵-۱- ارزیابی بازیابی(Recovery Evaluation)

ارزیابی خطای سیستماتیک یا Bias روش به دو صورت انجام گرفت. ابتدا میزان خطای سیستماتیک نسبی(Proportional Error) از طریق مطالعات بازیابی و با افزودن مقادیر مشخص از fPSA انجام گرفت. در این ارزیابی مقدار مشخصی از fPSA به نمونه های مختلف با محتوای fPSA متفاوت افزوده و سپس توانمندی سیستم اندازه گیری در تعیین و بازیابی مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\%Recovery = \frac{Concentration\ Recovered}{Concentration\ Added} \times 100$$

همچنین مقدار خطای سیستماتیک که به زبان ریاضی با Bias بیان می گردد، از رابطه زیر بدست آمد:

$$\%Bias = \frac{\bar{X}\ measured - expected}{Expected} \times 100$$

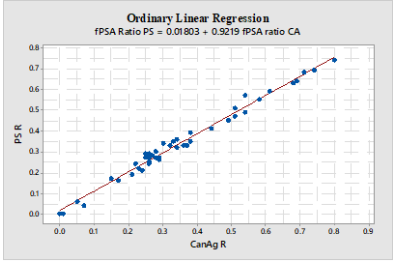
نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

Sample	Original Concentration (ng/mL)	1.86 ng/mL added	
		Recovery%	Bias
1	1.48	116.41%	9.03%
2	2.54	99.64%	-0.15%
3	3.52	111.42%	3.87%
4	4.22	115.05%	4.51%

۲-۵- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

بدلیل اهمیت سنجش همزمان tPSA و fPSA سنجش برروی ۴۷ نمونه بیمار با استفاده از کلیه معرف های کیت fPSA و tPSA پیشگامان و کیت های fPSA روش *CanAg Free PSA Ref 350-10* و *CanAg PSA ref340-10* (*n=47 PSA range 0.26-7.64*)مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) انجام و کسر fPSA/tPSA بدست آمده با هر دو جفت روش به روش رگرسیون خطی با یکدیگر مقایسه گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی، در ادامه آورده شده است:

$$PSI = 1.0681 CanAg + 0.0106$$
$$r = 0.991457$$
$$r^2 = 0.982987$$



٦- پدیده هوک

در این کیت ، اثر هوک تا غلظت PSA 150 ng/mL.دیده نشد.

منابع و مراجع

1. Catalona W.J. et al. (1995). Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. JAMA. 274(15):1214-20.
2. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.
3. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
4. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
5. CLSI. User Protocol for Evaluation of qualitative test performance; Approved guideline 2nd ed. CLSI document EP 12-A2. Garrett P.E. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2008.
6. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm
7. Gatalon, W.J. et al. (1991). Measurement of prostate specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. The England Journal of Medicine Anthropological Research, 324(17), 1156-61
8. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed.(pp. 580-84). Mc Graw Hill Education
9. McPherson R.A. et al (2017). Henry's Clinical Diagnosis and management by Laboratory Methods.23rd ed. (pp.1442-43) Elsevier Inc.
10. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 378-81) Elsevier Inc.
11. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp.472-75) Elsevier Inc.

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	۱.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ nm بجای ۴۵۰ nm)	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. ۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.

		۴.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱ . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استاندارد های جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	۱.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲ . تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. ۳.از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.
	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
عدم تولید رنگ در چاهک ها	استفاده از مواد سایر کیت ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول رنگزا	تکرار تست با محلول رنگزا جدید
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید

عدم تکرار پذیری مناسب	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید ۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ۵. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ۶. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهکها	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول های کیت	قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.

INTENDED USE:

Pishgaman Sanjesh Isatis, Free PSA ELISA KIT is intended for the quantitative determination of Free form of Prostatic Specific Antigen in human serum and plasma.

INTRODUCTION:

Prostate-specific antigen is a serine protease from kallikerin family which is synthesized uniquely in the epithelial cells of the prostate gland. Its synthesis is under the control of androgen receptor. Because of its high degree of tissue specificity, it is perhaps the most widely used tumor marker discovered thus far. Most synthesized PSA are transported into semen and is responsible for dissolving the seminal coagulum.

A small amount of PSA get into the bloodstream where it is rapidly inactivated by complexing with protease inhibitors such as alpha-1-antichymotrypsin (ACT), α-2-macroglobulin (to which it binds covalently), and α-protease inhibitor (API). These forms are collectively known as complexed PSA (cPSA). About 90 percent of cPSA exists in the form of complex with ACT and is measured in total PSA measurement kits, but complex with α-2-macroglobulin cannot be measured by conventional total PSA kits. Approximately 10-30% of total PSA exist in the free form without proteolytic activity.

Various surveys have shown prostate cancer prevalence between 36-51% among men aged 70-79 years old. PSA is produced by both nonmalignant and malignant epithelial cells and, as such, is prostate-specific, but not prostate cancer–specific. It may also increase in benign prostatic hypertrophy and prostatitis. Several measures has been proposed to increase diagnostic accuracy of total PSA measurement such as age-based reference interval, free PSA to total PSA ratio(fPSA/tPSA), specific measurement of PSA-ACT complex, PSA velocity(change in PSA level over time), PSA density(PSA level relationship to prostate size). Measurement of fPSA/tPSA ratio is likely to be most informative when total PSA is between 3 or 4 and 10 ng/mL (the so-called "diagnostic gray zone"). The ratio of fPSA/tPSA is lower in prostate cancer patients than in men with BPH and those without prostatic disease. In patients receiving therapy, particularly hormone withdrawal therapy, the fPSA/tPSA ratio cannot be utilized to differentiate prostate hyperplasia from cancer of prostate. An equimolar tPSA determination such as Pishgaman Sanjesh PSA ELISA KIT is the prerequisite for reliable ratios.

PRINICPLES OF THE METHOD:

The PSI fPSA ELISA Kit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. Calibrators, controls and patient samples are incubated together with a biotinylated Anti-fPSA monoclonal antibody and an HRP-conjugated monoclonal antibody; both recognize fPSA from different sites, in streptavidin coated microstrips. Free PSA present in calibrators/controls or samples is reacted with both antibodies to form a sandwich complex and adsorbed to the streptavidin-coated microstrips via the biotinylated Anti-fPSA Mab. The strip are then washed and, buffered substrate/chromogen reagent (hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction, a blue color will develop and the intensity of the color is directly proportional to the amount of fPSA present in the samples.

REAGENTS PROVIDED:

Reagent	Quantity/48 Test KIT	Quantity/96 Test KIT	Reconstitution
Microplate (96 breakable wells) coated with Streptavidin	48 wells	96 wells	Ready to Use
Calibrators 1-6 (0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0 and 10 ng/mL) in buffer, containing preservative	6 Vials/1.0 ml	6 Vials/1.0 ml	Ready to Use
Controls N = 2 in buffer compatible with human serum matrix with preservatives	2Vials/1.0 ml	2Vials/1.0 ml	Ready to Use
Enzyme Conjugate (red color)	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12 ml	Ready to use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30ml	1 Vial/30 ml	Dilute 20X with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide)	1 Vial/6.0ml	1 Vial/12ml	Ready to Use
Stop solution (HCl 2N) Additional information about other additive is considered proprietary.	1 Vial/3.0 ml	1 Vial/6.0 ml	Ready to Use

Materials required but not supplied with kit

The following materials are required but not provided in the kit:

- Distilled water with conductivity < 1µS
- Precision micropipettes for delivery of 50, 100 microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-100 µL is useful but not essential.
- Pipettes for dispensing milliliter volumes.
- Vortex mixer
- Automatic washer or any other device which can deliver 350 microliter wash solution for microplates
- Microplate reader with a filter set at 450 nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see measurement procedure step 9).

STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- If kept at 2-8°C, before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date as indicated on the label on the outside of the kit box.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the preparation day.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration of regents. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colorless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue color, in which case it should not be used.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI fPSA kit.

•If the measurement cannot be done within 3 hours after sample collection, samples should be kept at 2-8 °C up to 24 hours. For longer storage, serum or plasma must be stored at -20°C.

•Avoid repeated freeze and thaw cycles. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

•For Professional in vitro diagnostic Use Only

•All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of fPSA in human serum. The kit is not calibrated for the determination of fPSA in urine, semen, Non-EDTA plasma or other biologic specimens of human or animal origin.

•Before starting the assay, read this instruction completely and carefully. Use the valid version of the instruction provided with the kit. Be sure that everything is understood

•Please refer to the Guidelines for safe Work practice in Human and animal medical diagnostic laboratories recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel. MMWR Supplement / Vol. 61, January 6, 2012" or any other local or national regulation.

•Handle all patient specimens as potentially infectious.

•Reagents contain sodium azide (NaN3) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Follow local guidelines for disposal of all waste material.

•Avoid any skin contact with all reagents; stop solution contains strong acid. In case of contact, wash thoroughly with soap and water.

Caution

•Material used in the preparation of human source reagent has been tested and found to be non-reactive for HIV 1 & 2 antibodies, HCV antibody and hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they were potentially infectious.

Preparation of reagents:

Wash Buffer:

According to volume required, pour the desired volume of concentrated wash solution into a clean container and dilute 1:20 by adding adequate volume of distilled or deionized water to give a buffered Wash Solution. E.g. 10 mL wash concentrate to 190 mL distilled water. Wash solution should be prepared daily and discard unused working wash solution at the end of the day.

HANDELING NOTES:

•Do not use the kit or components beyond expiry date.

•Do not mix up vials caps.

•Do not mix reagents from different kit lots.

•All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use.

•A calibrator curve must be established for every run.

•Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Vertical alignment is recommended.

• Use a clean container and high quality distilled or deionized water to prepare the working wash solution.

•In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

•For the dispensing of Chromogenic and Stop solution, avoid pipettes with metal parts.

•High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

•Adhere the incubation times carefully. Tolerance limit of incubation time is ±5%

•Although, fPSI PSA EIA kit uses streptavidin coated plate technology and reaction does not proceed before adding conjugate solution, but to avoid drift, arising from low volume sample evaporation or incubation time difference between first and last well, it is strongly recommended not to run more than six strips when pipetting manually (Time delay).

•Perform all steps consecutively without any delay. Any delay in each step has deleterious effects on measurement results.

•Draw a calibration curve for each run, do not use stored curve from previous runs.

•Incubation with Chromogenic solution must be done in dark.

•Opened reagents are stable maximally for 8 weeks if they are not contaminated, and stored in resealed original containers and handled as prescribed. Return to 2-8°C immediately after use

•Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations

Measurement Procedure:

1. Remove the required number of well strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
2. Pipette 50 µL of each Calibrator (calibrators 0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0 and 10 ng/mL), controls and patient samples in duplicate into the appropriate wells.
3. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid.
4. Gently mix for 15 seconds
5. Cover the plate with an adhesive seal and incubate for 45-minutes at room temperature (20-27°C).
6. Wash the plate according to procedure below.

i. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
ii. Aspirate the content of each well.
iii. Repeat 4 additional wash for a total of 5 wash cycles.
iv. After the end of last wash cycle invert the plate and tap it carefully against an absorbent paper.

Note: Automatic strip washer: Follow the manufacturer's instructions for maintenance and wash the required number of wash cycles after second incubation step

7. Add 100 µL of Chromogenic solution TMB to each well using the same pipetting technique as in item 3. The Chromogenic solution TMB should be added to the wells as quickly as possible and the time between addition to the first and last well should not exceed 5 min.

8. Incubate for 15 min at room temperature preferentially in dark. Avoid exposure to direct sunlight.
9. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm in a microplate spectrophotometer within 5 min after addition of Stop Solution.

Important Note: *always add stop solution in the same order as chromogenic solution TMB.*

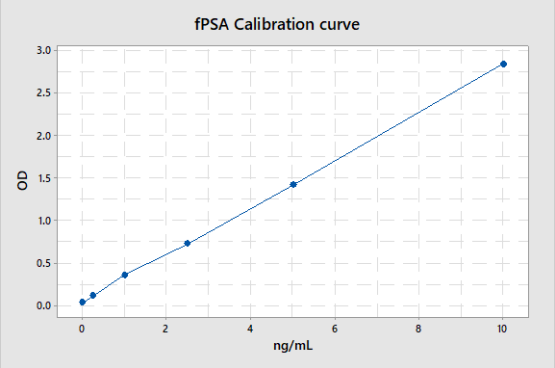
CALCULATION OF RESULTS

1. Construct a calibration curve by plotting the average O.D. (450 nm) for each calibrator on the vertical (Y) axis against the concentration on the horizontal (X) axis, and draw a best fit curve through the points on the graph.
2. To determine concentration of fPSA in each sample, first locate the O.D. value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the corresponding concentration.
3. If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each of the PSA calibrators. For automatic calculation of fPSA results, it is recommended to use point-to-point method.

Typical Data:

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real-time calibration curve.

calibrator	OD	ng/mL
1	**0.03**	**0**
2	**0.11**	**0.25**
3	**0.35**	**1.0**
4	**0.72**	**2.5**
5	**1.41**	**5.0**
6	**2.83**	**10**



Quality control:

Free PSA control serums should be used for validation of the assay series. Ranges of expected results are indicated on the vial label. If assigned range are not obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the assay shall be repeated. Each laboratory can also prepare its on serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay.

Reference values

Free PSA measurement must be used with an equimolar test such as Pishgaman Sanjesh PSA ELISA (PSPS-01) for Total PSA in order to generate reliable fPSA/tPSA ratio. Serum specimens

from 48 men diagnosed as benign prostatic hyperplasia (BPH) and 68 men diagnosed as prostate cancer (PCa) by DRE, were analysed by PSI fPSA and Total PSA ELISA kits and the following results were obtained:

Diagnosis	fPSA/tPSA		
	Median	Range	Mean
BPH	0.19	0.04-0.4	0.2
PCa	0.09	0.02-0.5	0.11

The optimum cut-off in different clinical disciplines depends upon the clinical intended use of results, and desired diagnostic sensitivity and specificity. Diagnostic sensitivity and specificity move inversely, as sensitivity increases, specificity decreases and vice versa. Low specificity correlates with high rate of false negatives and Low sensitivity with high rate of false positives for PCa. Sensitivities (%correctly diagnosed PCa) and specificities (%correctly diagnosed BPH) for different fPSA/tPSA ratio cut-offs are shown below:

Note: The laboratory must provide information about diagnostic sensitivity and specificity and false results rate for customers as requested.

fPSA/tPSA	PCa(TP/FP)	BPH(TN/FN)	Diagnostic Sensitivity(CI)	Diagnostic Specificity(CI)
0.09	32 /3	45/36	47.06 %(34.83% to 59.55%)	93.75% (82.80% to 98.69%)
0.13	50/9	39/18	73.53% (61.43% to 83.50%)	81.25% (67.37% to 91.05%)
0.23	66/33	15/2	97.06 %(89.78% to 99.64%)	31.25 %(18.66% to 46.25%)

PERFORMANCE CRITERIA:

1. Detection capabilities:

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 guideline.

In brief Limit of Blank was determined as the 95th percentile value from n = 60 measurements on standard 0 over several runs. The Limit of Blank equals to the concentration that 95% of repeated measurements on zero standard give value below it. In the next step, we determined standard deviation of repeated measurements on 3 samples with fPSA contents less than 0.1 ng/mL determined from a separate method study (ECLIA Method). By adding, the LOB calculated at 1st step to 1.645 times the greatest standards deviation calculated in the 2nd step ($LOD = LOB + 1.645SD_L$) LOD calculated as 0.05 ng/mL.

2. Precision:

Precision was determined using PSI fPSA reagents and three human pooled sera in different levels of measuring range (0.05-10 ng/mL) according to EP05-A3 Guideline.

Three runs per day (morning, midday and afternoon) by 3 user in 10 working days($10 \times 3 \times 3$) performed on these samples Results analyzed by fully nested ANOVA using a spreadsheet. The results are summarized in table below:

Sample Description	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	**0.33**	**0.017**	**5.15**	**0.036**	**10.91**
Patient Pool	**3.04**	**0.125**	**4.11**	**0.428**	**14.08**
Patient Pool	**7.20**	**0.481**	**6.67**	**0.581**	**8.07**

3. specificity

Interference evaluation from common sample abnormalities, hemolysis, Lipemia and icterus were determined according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP07-A2 guideline and %interference calculated using following formula:

$$\%interference = \frac{measured\ value - true\ value}{true\ value} \times 100\%$$

No interference were seen up to following listed concentration:

Compound	Concentration with no Significant interference
Lipemia (Intralipid)	1000 mg/dL
Bilirubin(unconjugated)	20 mg/dL
hemoglobin	500 mg/dL

4. Linearity

Evaluation of Linearity was performed according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP 06-A guideline. In brief a sample with high fPSA (9.65 ng/mL) was diluted with a low fPSA sample (0.34 ng/mL) in different proportions and their fPSA, measured in duplicate on each dilution. Measured values compared with expected values which estimated by dilution formula, then % bias and %recovery calculated for each concentration and following results are obtained:

No	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mL)	Rep 2 (ng/mL)	recovery%	%Bias
1	1	9.65	9.33	9.97	NA	NA
2	0.9	8.72	8.39	8.53	97%	-2.9%
3	0.8	7.79	7.48	7.97	99%	-0.8%
4	0.7	6.86	6.88	6.97	101%	1.0%
5	0.6	5.93	6.20	7.06	112%	11.9%
6	0.5	4.99	5.24	5.71	110%	9.6%
7	0.4	4.06	4.59	4.46	111%	11.5%
8	0.3	3.13	3.32	3.33	106%	6.1%
9	0.2	2.20	2.34	2.42	108%	8.3%
10	0.1	1.27	1.29	1.32	103%	2.8%
11	0	0.34	0.34	0.34	NA	NA

5. Trueness:

5.1. Recovery Evaluation (Proportional error)

Recovery was assessed by adding a given amount (1.86 ng/mL) of fPSA to 4 samples with different fPSA contents. Then % recovery and % bias was calculated for each sample using the equations below:

$$Recovery = 100 \times \frac{concentration\ recovered}{concentration} added$$

$$\%Bias = \frac{\bar{X}\ measured - expected}{Expected} \times 100$$

The results are summarized in the following table:

Sample	Original Concentration (ng/mL)	1.86 ng/mLadded	
		Recovery%	Bias
1	1.48	116.41%	9.03%
2	2.54	99.64%	-0.15%
3	3.52	111.42%	3.87%
4	4.22	115.05%	4.51%

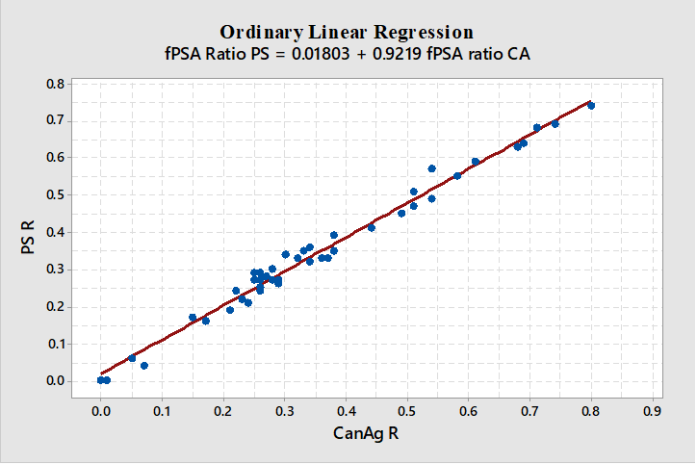
5.2. Trueness (Method comparison)

A comparison of equimolar methods (PSI PSA /Free PSA ELISA Kits) and (CanAg PSA ref no: 340-10/Free PSA ref no: 350-10) were performed using 47 patient samples and fPSA/tPSA ratio obtained by each pair of methods compared by ordinary linear regression. Following results were obtained:

$$PSI = 1.0681 CanAg + 0.0106$$

$$r = 0.991457$$

$$r^2 = 0.982987$$



6. High dose hook effect

In PSI Free PSA EIA kit high dose hook effect has not been seen up to 150 ng/mL

REFERENCES:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.
2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
4. CLSI. User Protocol for Evaluation of qualitative test performance; Approved guideline 2nd ed. CLSI document EP 12-A2. Garrett P.E. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2008.
5. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm
6. Gatalon, W.J. et al. (1991). Measurement of prostate specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. The England Journal of Medicine Anthropological Research, 324(17), 1156-61
7. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed.(pp. 580-84). Mc Graw Hill Education
8. McPherson R.A. et al (2017). Henry's Clinical Diagnosis and management by Laboratory Methods.23rd ed. (pp.1442-43) Elsevier Inc.
9. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 378-81) Elsevier Inc.
10. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp.472-75) Elsevier Inc.

Procedure in-brief